

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-500735

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)1月26日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 15/10

C 1 2 Q 1/68

A 9453-4B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平5-516011  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)3月11日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)11月11日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 2 2 4 6  
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 1 8 1 7 6  
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)9月16日  
 (31) 優先権主張番号 8 5 0 , 3 4 3  
 (32) 優先日 1992年3月11日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 0 3 3 , 0 8 4  
 (32) 優先日 1993年3月11日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ダナーファーバー・キャンサー・インスチ  
 チュート・インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115,  
 ボストン, ベニー・ストリート 44  
 (72) 発明者 リャン, ベン  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02172,  
 ウォータータウン, ラングドン・アベニュー  
 125  
 (72) 発明者 パーディー, アーサー・ビー  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02146,  
 ブルックリン, コッドマン・ロード 30  
 (74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外 6 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メッセンジャーRNAの同定、単離およびクローニング

(57) 【要約】

cDNAとしてmRNAを単離する方法であって、少なくとも2つのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ増幅法である。ひとつのアプローチとしては、第一のプライマーはmRNAのポリAテイルの最初のAリボヌクレオチドのすぐ上流の部位にハイブリダイズすることができる配列を含み、そして第二のプライマーは任意の配列を含む。他のアプローチとしては、第一のプライマーはmRNAのポリAシグナル配列を含む部位にハイブリダイズすることができる配列を含み、そして第二のプライマーは任意の配列を含む。他のアプローチとしては、第一のプライマーは公知の配列を有するmRNAの配列に実質的に相補的な配列を含み、そして第二のプライマーは任意の配列を含む。他のアプローチとしては、第一のプライマーは任意の配列を含み、そして第二のプライマーは公知の配列を有するmRNAの配列に実質的に同一な配列を含む。第一のプライマーはmRNAの逆転写のためのプライマーとして用いられ、そして豊富なcDNAは、該第一のプライマーおよび第二のプライマーをプライマーセットとして用いてポ

リメラーゼにより増幅される。

## 請求の範囲

1. mRNAと第一オリゴデオキシヌクレオチドとを、上記オリゴデオキシヌクレオチドがmRNAのポリAテイルの第一Aリボヌクレオチドのすぐ上流の配列を含む部位においてmRNAとハイブリダイズするような条件下で接触させ、

上記第一オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、およびリバーストランスクリプターゼを用いてmRNAを逆転写することにより、上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが上記mRNAとハイブリダイズする部位から上流の上記mRNAの少なくとも一部に相補的なDNA第一鎖を生成し、

該DNA第一鎖を、第二オリゴデオキシヌクレオチドがDNAとハイブリダイズする条件下で、該第二オリゴデオキシヌクレオチドと接触させ、

DNAポリメラーゼを用いて該第二オリゴデオキシヌクレオチドを伸長合成して、上記DNAの第一鎖にハイブリダイズする上記第二オリゴデオキシヌクレオチドの部位の下流の上記DNA第一鎖に相補的なDNA第二鎖を生成し、そして

上記第一および第二オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、そしてDNAポリメラーゼを用いて上記DNAの第一鎖および第二鎖を増幅する工程からなる、核酸サンプル中の、mRNAに相補的なDNAを単離するための非特異的クローニング法。

2. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが、ポリAテイルの第一Aリボヌクレオチドの少なくとも1塩基上流および隣接塩基を含む部位で上記mRNAとハイブリダイズする、請求項1記載の方法。

3. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが、ポリAテイルの第一Aリボヌクレオチドの少なくとも2塩基上流および隣接塩基を含む部位で上記mRNAとハイブリダイズする、請求項2記載の方法。

4. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが、少なくとも11塩基からなるポリA相補的領域、上記ポリA相補的領域の上流、および少なくとも1塩基からなる非ポリA相補的領域を含む、請求項1記載の方法。

5. 上記非ポリA相補的領域が少なくとも2つの隣接する塩基を含む、請求項4

記載mRNAの少なくとも一部に相補的なDNA第一鎖を生成し、

該DNA第一鎖を、第二オリゴデオキシヌクレオチドがDNAとハイブリダイズする条件下で、該第二オリゴデオキシヌクレオチドと接触させ、

DNAポリメラーゼを用いて該第二オリゴデオキシヌクレオチドを伸長合成して、上記DNAの第一鎖にハイブリダイズする上記第二オリゴデオキシヌクレオチドの部位の下流の上記DNA第一鎖に相補的なDNA第二鎖を生成し、そして

上記第一および第二オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、そしてDNAポリメラーゼを用いて上記DNAの第一鎖および第二鎖を増幅する工程からなる、核酸サンプル中の、mRNAに相補的なDNAを単離するための非特異的クローニング法。

17. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも5ヌクレオチドからなる、請求項16記載の方法。

18. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9ヌクレオチドからなる、請求項16記載の方法。

19. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも6デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項16記載の方法。

20. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項16記載の方法。

21. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドがランダムに選択されたヌクレオチド配列を含む、請求項16記載の方法。

22. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドが選択された任意の配列を含む、請求項16記載の方法。

23. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドがdC、dG、dTおよびdAを含む、請求項16記載の方法。

24. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドが制限酵素認識部位を含む、請求項16記載の方法。

25. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが、公知配列のmRNA内に含まれる

記載の方法。

6. 上記非ポリA相補的領域が3'-NVを含むが、その際、VはdA、dCまたはdGのうちのひとつであり、そして、NはdA、dT、dCまたはdGのうちのひとつで請求項5記載の方法。

7. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも13塩基からなる、請求項4記載の方法。

8. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも6デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項1記載の方法。

9. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項1記載の方法。

10. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドがランダムに選択されたヌクレオチド配列を含む、請求項1記載の方法。

11. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドが選択された任意の配列を含む、請求項1記載の方法。

12. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドがdC、dG、dTおよびdAを含む、請求項1記載の方法。

13. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドが制限酵素認識部位を含む、請求項1記載の方法。

14. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが、公知配列のmRNA内に含まれる配列と同一の配列を含む、請求項1記載の方法。

15. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドの少なくともひとつが多数のオリゴデオキシヌクレオチドからなる、請求項1記載の方法。

16. mRNAと第一オリゴデオキシヌクレオチドとを、上記オリゴデオキシヌクレオチドがmRNAのポリAテイルを含む部位においてmRNAとハイブリダイズするような条件下で接触させ、

上記第一オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、およびリバーストランスクリプターゼを用いてmRNAを逆転写することにより、上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが上記mRNAとハイブリダイズする部位から上流の上

記配列と同一の配列を含む、請求項16記載の方法。

26. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドの少なくともひとつが多数のオリゴデオキシヌクレオチドからなる、請求項16記載の方法。

27. mRNAと第一オリゴデオキシヌクレオチドとを、上記オリゴデオキシヌクレオチドがある部位においてmRNAとハイブリダイズするような条件下で接触させ、

上記第一オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、およびリバーストランスクリプターゼを用いてmRNAを逆転写することにより、上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが上記mRNAとハイブリダイズする部位から上流の上流mRNAの少なくとも一部に相補的なDNA第一鎖を生成し、

該DNA第一鎖を、下記第二オリゴデオキシヌクレオチドがコザック配列を含む部位においてDNAとハイブリダイズする条件下で、該第二オリゴデオキシヌクレオチドと接触させ、

DNAポリメラーゼを用いて該第二オリゴデオキシヌクレオチドを伸長合成して、上記DNAの第一鎖にハイブリダイズする上記第二オリゴデオキシヌクレオチドの部位の下流の上記DNA第一鎖に相補的なDNA第二鎖を生成し、そして

上記第一および第二オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、そしてDNAポリメラーゼを用いて上記DNAの第一鎖および第二鎖を増幅する工程からなる、核酸サンプル中の、mRNAに相補的なDNAを単離するための方法。

28. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9ヌクレオチドからなる、請求項27記載の方法。

29. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも10ヌクレオチドからなる、請求項27記載の方法。

30. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項27記載の方法。

31. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも10デオキシリボヌクレオ

チドからなる、請求項27記載の方法。

32. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドがランダムに選択されたデオキシリボヌクレオチド配列を含む、請求項27記載の方法。

33. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドの選択された任意の配列を含む、請求項27記載の方法。

34. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが制限酵素認識部位を含む、請求項27記載の方法。

35. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが、公知配列のmRNA内に含まれる配列と実質的に同一の配列を含む、請求項27記載の方法。

36. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドがさらに制限酵素認識部位を含む、請求項27記載の方法。

37. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドの少なくともひとつが多数のオリゴデオキシヌクレオチドからなる、請求項27記載の方法。

38. mRNAと公知配列のmRNA中の配列に実質的に相補的な塩基配列を有する第一オリゴデオキシヌクレオチドとを、上記オリゴデオキシヌクレオチドが上記実質的に同一な配列を含む部位においてmRNAとハイブリダイズするような条件下で接触させ、

上記第一オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、およびリバーストランスクリプターゼを用いてmRNAを逆転写することにより、上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが上記mRNAとハイブリダイズする部位から上流の上流mRNAの少なくとも一部に相補的なDNA第一鎖を生成し、

該DNA第一鎖を、第二オリゴデオキシヌクレオチドが上記DNA鎖とある部位でハイブリダイズする条件下で、該第二オリゴデオキシヌクレオチドと接触させ、

DNAポリメラーゼを用いて該第二オリゴデオキシヌクレオチドを伸長合成して、上記DNAの第一鎖にハイブリダイズする上記第二オリゴデオキシヌクレオチドの部位の下流の上記DNA第一鎖に相補的なDNA第二鎖を生成し、そして

流mRNAの少なくとも一部に相補的なDNA第一鎖を生成し、

該DNA第一鎖を、公知配列のmRNA中の配列と実質的に同一な配列を有する第二オリゴデオキシヌクレオチドに接触させるが、その際、上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが上記実質的に同一な配列を含む部位において上記第一DNA鎖にハイブリダイズする条件下で行い、

DNAポリメラーゼを用いて該第二オリゴデオキシヌクレオチドを伸長合成して、上記DNAの第一鎖にハイブリダイズする上記第二オリゴデオキシヌクレオチドの部位の下流の上記DNA第一鎖に相補的なDNA第二鎖を生成し、そして

上記第一および第二オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、そしてDNAポリメラーゼを用いて上記DNAの第一鎖および第二鎖を増幅する工程からなる、核酸サンプル中の、mRNAに相補的なDNAを単離するための非特異的クローニング法。

49. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項48記載の方法。

50. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも10デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項48記載の方法。

51. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項48記載の方法。

52. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも10デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項48記載の方法。

53. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドがランダムに選択されたデオキシリボヌクレオチド配列を含む、請求項48記載の方法。

54. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドの選択された任意の配列を含む、請求項48記載の方法。

55. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが制限酵素認識部位を含む、請求項48記載の方法。

56. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが制限酵素認識部位をさらに含む、請

上記第一および第二オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、そしてポリメラーゼを用いて上記DNAの第一鎖および第二鎖を増幅する工程からなる、核酸サンプル中の、mRNAに相補的なDNAを単離するための非特異的クローニング法。

39. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項38記載の方法。

40. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも10デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項38記載の方法。

41. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項38記載の方法。

42. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも10デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項38記載の方法。

43. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが制限酵素認識部位をさらに含む、請求項38記載の方法。

44. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドがランダムに選択されたデオキシリボヌクレオチド配列を含む、請求項38記載の方法。

45. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドの選択された任意の配列を含む、請求項38記載の方法。

46. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドの上記塩基配列が制限酵素認識部位を含む、請求項38記載の方法。

47. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドの少なくともひとつが多数のオリゴデオキシヌクレオチドからなる、請求項38記載の方法。

48. mRNAと第一オリゴデオキシヌクレオチドとを、上記オリゴデオキシヌクレオチドがある部位においてmRNAとハイブリダイズするような条件下で接触させ、

上記第一オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、およびリバーストランスクリプターゼを用いてmRNAを逆転写することにより、上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが上記mRNAとハイブリダイズする部位から上流の上

事項48記載の方法。

57. 上記第一または第二オリゴデオキシヌクレオチドの少なくともひとつが多数のオリゴデオキシヌクレオチドからなる、請求項48記載の方法。

58. mRNAと公知配列のmRNA中の配列と実質的に同一な配列を有する第一オリゴデオキシヌクレオチドとを、上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが上記実質的に同一な配列を含むある部位においてmRNAとハイブリダイズするような条件下で接触させ、

上記第一オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、およびリバーストランスクリプターゼを用いてmRNAを逆転写することにより、上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが上記mRNAとハイブリダイズする部位から上流の上流mRNAの少なくとも一部に相補的なDNA第一鎖を生成し、

該DNA第一鎖を、第二オリゴデオキシヌクレオチドに接触させるが、その際、上記第二オリゴデオキシヌクレオチドがコザック配列を含む部位において上記DNA鎖にハイブリダイズする条件下で行い、

DNAポリメラーゼを用いて該第二オリゴデオキシヌクレオチドを伸長合成して、上記DNAの第一鎖にハイブリダイズする上記第二オリゴデオキシヌクレオチドの部位の下流の上記DNA第一鎖に相補的なDNA第二鎖を生成し、そして

上記第一および第二オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして、そしてDNAポリメラーゼを用いて上記DNAの第一鎖および第二鎖を増幅する工程からなる、核酸サンプル中の、mRNAに相補的なDNAを単離するための非特異的クローニング法。

59. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項58記載の方法。

60. 上記第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも10デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項58記載の方法。

61. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項58記載の方法。

62. 上記第二オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも10デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項58記載の方法。

特 表 平 7-500735 (4)

明細書

メッセンジャーRNAの同定、単離およびクローニング

発明の背景

本出願は1992年3月11日に出版された係属中の米国出願第07/850,343号の一部係属出願である。

本発明は、個々のmRNAの検出法およびクローニング法に関する。

細胞中の遺伝子の活性はそれらのmRNAおよび蛋白質の量および量に反映される。遺伝子発現は、加齢、発育、分化、代謝経路、セルサイクルの進行、および感染疾患または遺伝疾患および他の疾患の状態のような過程において極めて重大である。発現されたmRNAの同定はそれらの分子機構の解明、および上記過程の応用に価値があるであろう。

哺乳動物細胞は約15,000の異なるmRNA配列を含むが、しかしながら、各mRNA配列は細胞内で異なった頻度で存在する。通常、3つのレベルのうちの一つで発現する。一部の「豊富な」mRNAは細胞あたり約10,000コピー存在し、約3,000〜約4,000の「中間体」mRNAは細胞あたり約300〜500コピー存在し、そして約11,000の「あまり豊富でない」あるいは「稀な」mRNAは細胞あたり約15コピー存在する。中間体および低頻度のmRNAにより数えられる多数の遺伝子が既に確立されたさまざまな技術によりクローン化される(例えば、サムブルック(Sambrook)ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, pp. 8.6-8.35を参照せよ)。

遺伝子の配列または蛋白質についていくらかの知見があれば、いくつかの直接的クローニング法が利用可能である。しかしながら、所望の遺伝子の所在が未知であれば、所望の遺伝子産物を選択または豊富にすることにより、多大な時間および資源を浪費することなく該「未知の」遺伝子を同定することができるにちがいない。

未知の遺伝子の同定は、サブトラクティブハイブリダイゼーション技術または

別々のハイブリダイゼーション技術の使用をしばしば含む。サブトラクティブハイブリダイゼーション技術は、極めて密接に関連した細胞集団の使用に頼り、例えば、異なる遺伝子発現が主として所望の遺伝子に関与する場合である。サブトラクティブハイブリダイゼーション技術の鍵を握る要素は包括的な相補的DNA(cDNA)ライブラリーの構築である。

相補的DNAライブラリーの構築は現在かなり日常的な工程である。ポリA mRNAを所望の細胞から調製し、そしてRNA依存性DNAポリメラーゼ(「逆転写酵素」)および12〜18のチミンからなるオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いてcDNAの第一鎖を合成する。cDNAの第二鎖は幾つかの方法の一つにより合成するが、最も効果的な方法は、「置換合成」および「プライムド合成」として広く知られている。

置換合成は、RNA:DNAハイブリッド中のRNAのホスホジエステルバックボーンを分断して3'ヒドロキシルおよび5'リン酸を残すリボヌクレアーゼH(「RNAase H」)の使用を含み、mRNA鎖にニックおよびギャップを生じさせ、大腸菌DNAポリメラーゼまたはそのクレノウ断片により用いられる一連のRNAプライマーを作ることによりcDNAの第二鎖を合成する。この反応は極めて効果的であるが、生成されるcDNAがmRNA配列の5'末端を欠いていることがしばしばある。

第二cDNA鎖を生成するためのプライムド合成は、置換合成よりも難しい幾つかの方法の一般名であるが、高い効率で5'末端の配列をクローン化する。通常、cDNA第一鎖の合成後、cDNA鎖の3'末端はターミナルトランスフェラーゼにより伸長合成され、該酵素はデオキシヌクレオチド、最も共通にはデオキシシチジンのホモポリマーテイルを付加する。該テイルは次に、デオキシグアニジルプライマーまたはデオキシグアニジル化されたテイルを有する合成DNA断片にハイブリダイズし、そしてDNA依存性DNAポリメラーゼを用いてcDNA第二鎖が合成される。

プライムド合成法は効果的であるが、該法は労力を要し、生成されるcDNAクローンの全てが、mRNA配列のすぐ上流のデオキシグアニジルトラクト(1

rac1)を有する。該デオキシグアニジルトラクトはインビトロまたはインビボにおいてDNAの転写を阻害し得、そしてサンガーのジデオキシヌクレオチド配列決定法によるクローンの配列決定を阻害し得る。

cDNAの両鎖が合成されたならば、適切なプラスミドまたはウイルスベクター中に該cDNAをクローン化することによりcDNAライブラリーを構築する。特に、この工程は、平滑末端を生じるように制限酵素により消化されたベクターに、該cDNAの平滑末端を直接連結することにより実施することができる。平滑末端の連結は極めて効率が低いが、これは一般的選択法ではない。通常使用される方法は、制限酵素認識配列を含む合成リンカーまたはアダプターを該cDNAの末端に付加することを含む。次に、該cDNAを高い頻度で所望のベクターにクローン化することができる。

相補的cDNAライブラリーがセルラインから構築されたなら、サブトラクティブハイブリダイゼーションにより所望の遺伝子が同定される(例えば、Sargent T. D., 1987, Meth. Enzymol., Vol. 152, pp. 423-432; Leeら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 88, pp. 2825-2830を参照せよ)。サブトラクティブハイブリダイゼーションの一般的な方法は、以下のとおりである。cDNAの相補鎖を合成して標識する。この一本鎖cDNAは、ポリA mRNAまたは存在するcDNAライブラリーから作ることができる。該標識cDNAを近縁細胞集団からの過剰量のmRNAとハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション後、ヒドロキシアパタイトカラムのクロマトグラフィーによりcDNA:mRNAハイブリッドを単離する。次に、残りの「引かれた」標識cDNAを用いて、同一細胞集団のcDNAまたはゲノミックDNAをスクリーニングする。

サブトラクティブハイブリダイゼーションは両細胞集団において発現される遺伝子の大多数を除き、そして即ち所望の細胞集団にのみ存在する遺伝子を豊富にする。しかしながら、特定のmRNA配列の発現がわずかな時間のみ、引かれた集団より所望の細胞集団でより豊富になるのならば、引かれたハイブリダイゼー

ションによる遺伝子の単離は不可能かもしれない。

#### 発明の概要

我々は、少なくとも2種のオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ増幅法により、mRNAをcDNAとして同定、単離およびクローニングする方法を開発してきた。ひとつのアプローチとして、第一のプライマーはmRNAのポリAテイルの最初のAリボヌクレオチドのすぐ上流の配列を含む部位にハイブリダイズすることができる配列を含み、そして第二のプライマーは任意の(arbitrary)配列を含む。他のアプローチにおいて、第一のプライマーはmRNAのポリAシグナル配列を含む部位にハイブリダイズすることができる配列を含み、そして第二のプライマーは任意の配列を含む。他のアプローチにおいて、第一のプライマーは任意の配列を含み、そして第二のプライマーはmRNAのコザック(Cozack)配列を含む部位にハイブリダイズすることができる配列を含む。他のアプローチにおいて、第一のプライマーは既知の配列を有するmRNAの特定の配列に実質的に相補的な配列を含み、そして第二のプライマーは任意の配列を含む。他のアプローチにおいて、第一のプライマーは任意の配列を含み、そして第二のプライマーは既知の配列を有するmRNAの特定の配列と実質的に同一の配列を含む。第一のプライマーはmRNAの逆転写のためのプライマーとして用いられ、そしてその結果生じるcDNAは第一のプライマーおよび第二のプライマーをプライマーセットとして用いてポリメラーゼにより増幅される。

従来可能な異なるペアのプライマーを用いるこの方法により、極めて微量でしか存在しないmRNAを含む事実上あらゆるまたはすべてのmRNAを、あらゆる細胞またはあらゆるセルサイクルのステージから同定および単離することができる。さらに、例えば発生の異なるステージまたはセルサイクルの異なるステージにあるかもしれない密接に関連した細胞からのmRNA種の比較から、どのmRNAが構成的に発現され、そして分化により発現されるか、および各々の発現頻度が示される。

本明細書にて使用される「第一のプライマー」または「第一のオリゴデオキシ

生成できる。本明細書において定義される、単語「ハイブリダイゼーション」および「ハイブリダイズ」はmRNAまたはcDNA鎖との間のオリゴデオキシヌクレオチドの塩基対として定義される。本明細書において使用される、オリゴデオキシヌクレオチドがmRNAまたはcDNAとハイブリダイズする「条件」は、mRNAまたはcDNAとの間のオリゴデオキシヌクレオチドの塩基対が生じ、かつ、ほんのわずかなミスマッチ(ひとつまたはふたつ)の塩基対が許容される温度および緩衝液の条件(以下に記載される)であると定義される。

オリゴヌクレオチドプライマーは既知のmRNAの「コンセンサス配列」であることが知られている配列を含む。本明細書において定義されるように、「コンセンサス配列」は、同様の機能および同様の特性を有する蛋白質の遺伝子ファミリーにおいて見いだされる配列である。コンセンサス配列を含むプライマーの使用は、所望の遺伝子ファミリーの追加のメンバーのクローニングをもたらす。

本明細書において使用される、オリゴデオキシヌクレオチドプライマーの「好ましい長さ」は、アニーリングの所望の特異性および細胞中の全てのmRNAにハイブリダイズするために必要な所望の特異性を有するオリゴデオキシヌクレオチドの数から決定される。20ヌクレオチドのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーは、10ヌクレオチドのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーよりも特異的であるが、しかしながら、オリゴデオキシヌクレオチドプライマーへのそれぞれランダムなヌクレオチドの4つほどの付加は、細胞中の各mRNAがハイブリダイズするのに必要なオリゴデオキシヌクレオチドプライマーの数を増加させる。

一つの局面において、一般的に、本発明は、mRNAのポリAテイルの第一のAリボヌクレオチドのすぐ上流の配列を含む部位にハイブリダイズすることができる配列を含む第一のオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いて逆転写するためにmRNAを調製し、そして、上記第一のプライマーと第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマー、例えば、任意の配列を有するプライマー、をプライマーセットとして用いるポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅することによ

メクレオチド」は、mRNAの逆転写に用いられることによりcDNAの第一鎖を作成し、そして次にcDNAの増幅にも使用されるオリゴデオキシヌクレオチドプライマーであると定義される。第一のプライマーは、このプライマーがmRNAにハイブリダイズし、かつcDNAの第一鎖の3'末端を規定する限りは、3'プライマーとも呼ばれる。本明細書にて使用される「第二のプライマー」は、cDNAの第二鎖を作成し、そして次にcDNAの増幅にも使用されるオリゴデオキシヌクレオチドプライマーであると定義される。第二のプライマーは、このプライマーがcDNAの第一鎖にハイブリダイズし、かつcDNAの第一鎖の5'末端を規定する限りは、5'プライマーとも呼ばれる。

本明細書にて使用されるオリゴデオキシヌクレオチドプライマー「任意の」配列は、個々の判断または数量に基づくかまたは支配されるものとして定義される。ある例として、任意の配列は完全にランダムかまたはひとつ以上の塩基に関して部分的にランダムでありうる。他の例として、任意の配列は特定の比率のデオキシヌクレオチドを含むように、例えば、ほぼ等しい比率の各デオキシヌクレオチドまたは一つのデオキシヌクレオチドを優勢に含むように選択されるか、または特定の制限酵素認識部位を含まないように選択される。任意の配列は、既知のmRNA配列に実質的に等しい(少なくとも50%が相同の)配列を含むか、または既知のmRNA配列を含まないように選択される。

オリゴデオキシヌクレオチドプライマーは、配列に対して相補的でも、実質的に同一でもありうる。本明細書において定義されるように、相補的オリゴデオキシヌクレオチドプライマーは、mRNAにハイブリダイズする配列を含み、塩基は互いに相補的であり、かつ逆転写酵素がプライマーを伸長合成してmRNAのcDNA鎖を形成するプライマーである。本明細書において定義されるように、実質的に同一のプライマーはmRNAの配列と同一の配列を含み、50%以上同一なプライマーであり、そして該プライマーはmRNAと同一の配向(orientation)を有し、即ちmRNAとはハイブリダイズしないかまたは相補的でないが、そのようなプライマーを用いてcDNAの第一鎖にハイブリダイズさせることができ、かつ、ポリメラーゼにより伸長合成してcDNAの第二鎖を

り、mRNAを同定および単離する方法に関する。

好ましい態様において、第一のプライマーはポリAテイルのすぐ上流のmRNA配列にハイブリダイズすることができるオリゴデオキシヌクレオチドの3'末端の少なくとも1ヌクレオチドを含み、かつ、ポリAテイルにハイブリダイズする5'末端の少なくとも1ヌクレオチドを含む。完全な3'オリゴデオキシヌクレオチドは少なくとも13ヌクレオチドの長さが好ましく、20ヌクレオチドまでの長さでありうる。

もっとも好ましくは、第一のプライマーはポリAテイルのすぐ上流のmRNA配列にハイブリダイズすることができるオリゴデオキシヌクレオチドの3'の2ヌクレオチドを含む。好ましくは、2つのポリA非相補的ヌクレオチドがVNであるが、その際、Vはデオキシアデニレート(dA)、デオキシグアニレート(dG)、またはデオキシシチジレート(dC)であり、そしてNは、3'末端ヌクレオチドがdA、dG、dCまたはデオキシチミレート(dT)である。即ち、好ましい第一のプライマーの配列は5'-TTTTTTTTTTTNN(配列番号1)である。2ヌクレオチドの使用は、mRNAとそのポリAテイルの間の連結部分(junction)における第一のプライマーの位置どりを正確に提供し、正確なオリゴデオキシヌクレオチドの並びが提供される:mRNAハイブリダイズは不正確に並んだものよりもより安定になり、即ち、正確に並んだヌクレオチド(ハイブリッド)が形成され、高い温度においてもハイブリダイズされたままのこる。好ましい態様においては、mRNAサンプルは12のアリコートに分割され、そして第一のプライマーの12の考えうるVN配列のひとつを各反応において使用してmRNAを逆転写を開始する。単一配列のオリゴデオキシヌクレオチドの使用は、mRNAサブセットへの結合、統計的には1/12、即ち、各サンプル中のmRNAの同定を単純化することにより各サンプル中の分析されるmRNAの数を減らす。

幾つかの態様においては、第一のプライマーの3'末端はポリAテイルのすぐ上流のmRNA配列にハイブリダイズすることができる1ヌクレオチドを含むことができ、そして5'末端の12ヌクレオチドはポリAテイルにハイブリダイズ

することができる、即ち、該プライマーは5' - T T T T T T T T T T T T V (配列番号2)を有するであろう。単一の非ポリA相補デオキシヌクレオチドの使用は、各mRNAの同定に必要なオリゴデオキシヌクレオチドの数を3に減らすことができるが、しかしながら、mRNA配列とポリAテイルの連結部分にプライマーをアニーリングさせるための単一ヌクレオチドの使用は、アニーリングの特異性の顕著な損失をもたらす、そして2つの非ポリA相補ヌクレオチドが好ましい。

幾つかの態様においては、第一のプライマーの3'末端はポリAテイルのすぐ上流のmRNA配列にハイブリダイズすることができる3以上のヌクレオチドを含みうる。3'末端への各ヌクレオチドの付加は正確に並んだ核酸分子の安定性を増加させ、そして、ポリAテイルにハイブリダイズさせるための配列は、添加された各付加的な非ポリA相補的ヌクレオチドに関する1ヌクレオチドにより低下させることができる。このような第一のプライマーの使用は、与えられたセルラインに含まれるmRNAの迅速なスクリーニングには実用的でなく、ポリAテイルのすぐ上流のmRNAのハイブリダイズする2以上のヌクレオチドと共に第一のプライマーを使用すると各mRNAを同定するのに必要なオリゴデオキシヌクレオチドの数が増加する。例えば、プライマー5' - T T T T T T T T T T T T N N V (配列番号3)は各mRNAに結合するために48の別々の第一プライマーの使用を必要とするはずであり、そして、与えられたセルラインからmRNAをスクリーニングするために必要な反応の数を顕著に増加させる。4つの群として一か所に単一のランダムなヌクレオチドを含むオリゴデオキシヌクレオチドの使用は、各mRNAを同定するために48の別々の反応を設定する必要の問題が解決しうる。しかしながら、非ポリA相補的配列がより長くなると、各mRNAを同定するのに必要な反応の数を増加させる必要性がすぐに生じる。

好ましい態様において、第二のプライマーは任意の配列を有し、そして9ヌクレオチドの長さである。好ましくは、第二のプライマーは多くて13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドの長さでありうる。

他の局面において、一般的には、本発明は、ポリアデニレーションシグナル配列にハイブリダイズすることができる配列および5'または3'に位置する少な

くとも4ヌクレオチド、またはポリアデニレーションシグナル配列の両方を含む第一プライマーを用いた逆転写のためにmRNA調製物をプライミングすることによりmRNAを調製および単離するための方法に関し；この完全第一プライマーは少なくとも10ヌクレオチドの長さが好ましく、そして20ヌクレオチドまでの長さでありうる。一つの好ましい態様においては、配列5' - N N T T T A T T N N (配列番号4)は、該配列がG C T T T A T T N C (配列番号5)であるように選択でき、その結果生じる4つのプライマーはmRNAの逆転写をプライミングするための単一反応において一緒に用いられる。第一のcDNA鎖が逆転写により作成されたならば、次に、第一のプライマーを、例えば任意の配列を含む第二のプライマーと共に用いてcDNAを増幅することができる。

一つの局面においては、一般的には、本発明は、cDNA第一鎖を生成するために第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いて逆転写のためにmRNA調製物をプライミングし、そしてmRNAのコザック配列と実質的に同一の配列を含む第二プライマーを用いてcDNA第二鎖調製物をプライミングすることからなるmRNAの同定および単離法、およびプライマーセットとして第一および第二プライマーを用いてポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅する方法に関する。

好ましい態様においては、第一および第二のプライマーは少なくとも9ヌクレオチドの長さであり、そしてせいぜい13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドまでの長さである。最も好ましいのは、第一および第二のプライマーが10ヌクレオチドの長さである。

好ましい態様においては、第一のプライマーの配列は、ランダムに選択されるか、または、第一のプライマーは選択された任意の配列を含むか、または第一のプライマーは制限酵素認識配列を含む。

好ましい態様においては、mRNAのコザック配列と実質的に同一の配列を含む第二のプライマーの配列は、配列N N N A N N A T G N (配列番号6)を有するか、または配列N N N A N N A T G G (配列番号7)を有する。Nは4つのデオキシヌクレオチドの任意のひとつである。いくつかの態様においては、第一の

プライマーはさらに、プライマーの長さを少なくとも5ヌクレオチド増加させるために、プライマーの5'または3'末端のいずれかに付加された制限酵素認識配列を含む。

他の局面においては、一般的には、本発明は、公知の配列を有する配列を含むmRNAの配列に実質的に相補的な配列を含む第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いた逆転写のためにmRNA調製物をプライミングし、そして、第二プライマーを用いてcDNA第二鎖の調製物をプライミングすることからなる、mRNAの同定法および単離法、およびプライマーセットとして第一および第二プライマーを用いてポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅する方法に関する。

好ましい態様においては、第一および第二プライマーは少なくとも9ヌクレオチドの長さであり、せいぜい13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドまでの長さである。最も好ましくは、第一および第二プライマーは10ヌクレオチドの長さである。

好ましい態様においては、第一プライマーはさらに制限酵素認識配列を含むが、該配列は、該オリゴデオキシヌクレオチドの長さを少なくとも5ヌクレオチド増加させるために、プライマーの好ましい10ヌクレオチドの範囲に含まれるかまたは3'または5'のいずれかに付加される。

好ましい態様においては、第二のプライマーの配列はランダムに選択されるか、または第二のプライマーは選択された任意の配列を含むか、または第二のプライマーは制限酵素認識配列を含む。

他の局面においては、一般的には、本発明は、第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いた逆転写のためにmRNA調製物をプライミングし、そして公知の配列を有するmRNAの配列と実質的に同一の配列を含む第二のプライマーを用いてcDNA第二鎖の調製物をプライミングすることからなる、mRNAの同定法および単離法、およびプライマーセットとして第一および第二プライマーを用いてポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅する方法に関する。

好ましい態様においては、第一および第二プライマーは少なくとも9ヌクレオ

チドの長さであり、せいぜい13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドまでの長さである。最も好ましくは、第一および第二プライマーは10ヌクレオチドの長さである。

好ましい態様においては、第一のプライマーの配列はランダムに選択されるか、または第一のプライマーは選択された任意の配列を含むか、または第一のプライマーは制限酵素認識配列を含む。

好ましい態様においては、公知の配列を有するmRNAの配列に実質的に相補的な配列を有する第二のプライマーの配列はさらに制限酵素認識配列を含み、該制限酵素配列はプライマーの好ましい10ヌクレオチド中に存在してよく、またはオリゴデオキシヌクレオチドプライマーの長さを少なくとも5ヌクレオチドまで増加させるべくプライマーの3'または5'末端のいずれかに付加されている。

他の局面において、一般的に、本発明は、公知配列を有するmRNAの配列に実質的に相補的な配列を含む第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いた逆転写のためにmRNA調製物をプライミングし、そしてmRNAのコザック配列と実質的に同一の配列を含む第二のプライマーを用いてcDNA第二鎖の調製物をプライミングすることからなる、mRNAの同定法および単離法、およびプライマーセットとして第一および第二プライマーを用いてポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅する方法に関する。

好ましい態様においては、第一および第二プライマーは少なくとも9ヌクレオチドの長さであり、せいぜい13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドまでの長さである。最も好ましくは、第一および第二プライマーは10ヌクレオチドの長さである。

本発明のそれぞれ一般的な局面の幾つかの好ましい態様においては、増幅されたcDNAは単離され、次に所望のcDNAは、ポリメラーゼ増幅反応および第一および第二プライマーを用いて再び増幅される。

本発明のそれぞれ一般的な局面の幾つかの好ましい態様においては、それぞれひとつ以上のプライマーからなる第一および第二オリゴデオキシヌクレオチドプ

ライマーのセットを使用することができる。幾つかの態様において、ひとつ以上の第一プライマーが逆転写反応に含まれ、そして、それぞれひとつ以上の第一および第二プライマーが増幅反応に含まれる。それぞれひとつ以上のプライマーの使用は各反応において同定されるmRNAの数を増加させ、そして使用されるプライマーの総数から、それぞれ個々のcDNAを完全に単離する可能性を残すように、cDNAを単離するための所望の方法に基づいて決定される。好ましい態様において、数百のcDNAが変成ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて単離および同定される。

本発明の方法は、サブトラクティブハイブリダイゼーションを利用する現在のクローニング技術を越えた顕著な進歩である。一つの局面においては、本発明の方法は、発見頻度を従来の遺伝子、並びに構成的発現および分化による発現によるmRNAが、簡単な可視的調査による同定および単離を可能にする。他の局面において、本発明の方法は、所望のmRNAをcDNAとして増幅するための特異的オリゴデオキシヌクレオチドを提供し、そして第二cDNA鎖のプライミングのためにcDNA第一鎖にホモポリマーテイルを付加する中間工程が不要になり、それにより、単離遺伝子およびその産物の続く分析においてホモポリマーテイルの干渉が避けられる。他の局面において、本発明の方法は、選択されたmRNAのクローニングおよび配列決定を可能にし、その結果、研究者は、完全鎖長の遺伝子産物に関する相対的cDNAのスクリーニングの前に、遺伝子の相対的必要性を決定するかもしれない。

#### 好ましい態様の説明

##### 図面

図1は、本発明の方法を模式的に表す。

図2は、正常マウス線維芽細胞(A31)のN1遺伝子の3'末端の配列である(配列番号9)。

図3は、正常細胞または腫瘍形成性マウス線維芽細胞の全細胞RNA上のN1配列のノーザンブロットである。

図4は、コザックプライマーのみ、AP-1プライマーのみ、コザックプライ

マクレオチドの間で変化させ、そしてポリAテイルの上流の末端においてハイブリダイズするように選択されたオリゴデオキシヌクレオチドの長さを7から14の間で変化させた。異なるセットおよび異なる長さのプライマーを用いた莫大な試験の後、生成物の特異性に関しては42℃のアニーリング温度が最適であり、そして内部でハイブリダイズするオリゴデオキシヌクレオチドは少なくとも9ヌクレオチドの長さであり、そして少なくとも13ヌクレオチドの長さのオリゴデオキシヌクレオチドがポリAテイルの上流末端への結合に必要であることが決定された。

今、図1を参照すると、本発明の方法は模式的に表現される。mRNAは第一プライマー、例えばTTTTTTT TTTTVN [配列番号2] (T<sub>11</sub>VN) (1)と混合され、そしてcDNA第一鎖を作成するために逆転写(2)される。以下のとおりcDNAを増幅する。cDNA第一鎖を第二のプライマーに添加し、そして適切な濃度のヌクレオチドおよび化合物を含む標準緩衝液中の第一プライマーおよびポリメラーゼを94℃に加熱してmRNA:cDNA雑種分子を変成し(3)、温度を42℃に低下させて第二のプライマーをアニールさせ(4)、そして次に温度を72℃に上げてポリメラーゼによる第二のプライマーの伸長合成を許す(5)。次に、この温度操作を繰り返して(6、7、8)、第一および第二のプライマーによりハイブリダイズされる配列の増幅を開始する。各配列の所望のコピー数が得られるまで、温度操作が繰り返される。

当業界においては明らかとなり、この増幅法は、温度安定性ポリメラーゼまたは温度不安定性ポリメラーゼを用いて実施することができる。温度不安定性ポリメラーゼを用いる場合、プライマーのアニーリング後に、伸長合成工程の始めに、新鮮なポリメラーゼを新型に加えなければならない、そして伸長合成工程は選択されたポリメラーゼの許容温度で実施されなければならない。

本発明の方法に関する以下の実施例は、例示の目的のみに示される。認識されたとおり、本発明の方法はあらゆる種からポリA mRNAの単離に使用することができ、そしてあらゆるレベルで、即ちまれなものから豊富なものまで、分化によるまたは構成的に発現される遺伝子の単離に使用することができる。

マーおよびAP-1プライマー、コザックプライマーおよびAP-2プライマー、コザックプライマーおよびAP-3プライマー、コザックプライマーおよびAP-4プライマー、およびコザックプライマーおよびAP-5プライマーを用いた、4つの縦(レーン1-4)から調製されたmRNAに関する増幅結果を示す、シークエンシングゲルである。このゲルは以下において完全に記載される。

図5は、mRNAの調製に先立って、非許容温度において培養され、次に許容温度(32、5℃)に24時間シフトしたA1-5セルラインからクローン化されたクローンKの5'末端の部分的配列である。該A1-5セルラインはrasおよび温度感受性変異体P<sup>14</sup> ("P<sup>14</sup>...")で二重形質転換された初期ラット胚線維芽細胞由来である。

#### 一般的な説明、本発明の方法の開発

例示の方法により、本発明の方法の実施例が以下に記載されるが、如何にして特定の例示の実施例が開発されたかを導くことにより記載される。

オリゴデオキシヌクレオチドの長さがmRNAへの特異的ハイブリダイゼーションに適切であることは、本発明の操作に重要である。特異的ハイブリダイゼーションを得るために、慣用的クローニング法またはPCRのいずれかにより、通常は、オリゴデオキシヌクレオチドは20またはそれ以上の長さに選択される。この例における長いオリゴデオキシヌクレオチドの使用は、各試験において同定されるmRNAの数を低下させ、そして各mRNAを同定するために必要なオリゴデオキシヌクレオチドの数を増加させるはずである。最近、PCRによるDNAポリモルフォリズム分析に9-20のヌクレオチドを使用できることが証明された[ウィリアムス(Williams)ら、1991, Nuc. Acids Res., Vol. 18, pp. 6531-6535]。

クローン化されたネズミのチミジンキナーゼを含むプラスミド("TK cDNA プラスミド")をモデルの動型として使用して、mRNAへの特異的ハイブリダイゼーション、および特異的PCR産物の生産のために必要とされるオリゴデオキシヌクレオチドの長さを決定した。mRNA中の内部でハイブリダイズするように選択されたオリゴデオキシヌクレオチドプライマーの長さを6から13

#### 実施例1

PCRによる正確な結果および生産性のある結果に必要な条件を用いた実験が、TK cDNA プラスミドおよび単一セットのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いて実施されたが、配列TTTTTTT TTTTTC A ("T<sub>11</sub>CA") [配列番号10]を選択してポリAテイルの上流末端にハイブリダイズさせ、そして配列CTTGATTGCC ("L<sub>11</sub>k3") [配列番号11]を選択してポリAテイルの288塩基対("bp")上流にハイブリダイズさせた。これら2つのプライマーを用いて期待される断片サイズは299bpである。

PCRは、当業界において公知の標準緩衝液の条件で、10ngのTK cDNA プラスミドを用いて実施された(緩衝液およびポリメラーゼはパーキンエルマー・シークス社から市販されている)。標準条件は、1μMの各プライマーの代わりに、2.5μMのT<sub>11</sub>CA [配列番号10]、および0.5μMのL<sub>11</sub>k3 [配列番号11]の濃度でプライマーを用いるように変更された。ヌクレオチド("dNTPs")の濃度も、100倍、即ち標準の200μMから2μMに変更された。PCRパラメーターは、変成工程が30秒で94℃、アニーリング工程が1分で42℃、そして伸長合成工程が30秒で72℃であった。dNTPの濃度が200μMのとき、顕著な量の非特異的PCR産物が観察され、dNTPsの濃度が20μMまたはそれ以下のときPCR産物が特異的に増幅された。PCR産物の特異性は、増幅DNAの制限酵素消化物により変更され、期待されたサイズの制限断片が生成された。幾つかの例において、第二のプライマーに対して5倍以上の第一プライマーの使用が産物の特異性を増加させたことが見いだされた。2μMへのdNTP濃度の低下により、PCR産物が高い特異活性で[α-<sup>32</sup>S] dATP、0.5μM [α-<sup>32</sup>S] dATP (Sp. Act. 1200 Ci/mmol)により標識されたが、このことは、高度分析変成ポリアクリルアミドゲル電気泳動、DNA塩基配列決定ゲル、による分析において、PCR産物を区別するのに必要である。

#### 実施例2

次に、短いオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いたPCR増幅法を促

用して、哺乳動物細胞中のmRNAサブセットを抽出した。全RNAおよびmRNAは、正常に生育させる「サイクリング(cycling)」または血清飢餓状態である「静止(quiescent)」のいずれかのマウス線維芽細胞から調製した。RNAおよびmRNAは、T<sub>11</sub>CA【配列番号10】をプライマーとして逆転写された。T<sub>11</sub>CA【配列番号10】は、mRNAとプライマーを共に65℃に加熱し、そして該混合物を徐々に35℃に冷やすことによりmRNAにアニールした。逆転写反応は、モロニーマウスの白血病毒の逆転写酵素を用いて35℃において実施された。その結果生成されたcDNAは、実施例1に記載されたように、2μMのdNTPsを用いてT<sub>11</sub>CA【配列番号10】およびLtk3【配列番号11】の存在下でPCRにより増幅された。T<sub>11</sub>CA【配列番号10】プライマーおよびLtk3【配列番号11】プライマーの使用は、使用されるTK mRNAを、まれなmRNA転写物の分化による発現に関する内部コントロールにする；TK mRNAは細胞あたり約30コピーで存在する。DNAシーケンシングゲルにより、さらなる分析において最適な100から500ヌクレオチドの大きさの範囲のmRNAが50から100増幅されたことが明らかとなった。サイクリング細胞または静止細胞において観察されるmRNA種のパターンは、いくつか違うものもあったが、期待されたよりもかなり小さかった。注意すべきことは、G1期およびS期において発現されるTK遺伝子mRNAは、期待されたとおり、サイクリング細胞のRNA調製物中でのみ見いだされ、即ち、この方法がTKのようなまれなmRNA種を分離または単離する可能性を証明している。

#### 実施例3

正常または腫瘍形成性マウス線維芽細胞中のmRNAの発現は、PCR増幅により、T<sub>11</sub>CA【配列番号10】プライマーおよびLtk3【配列番号11】プライマーを用いても比較された。mRNAは、T<sub>11</sub>CA【配列番号10】をプライマーとして逆転写され、そしてその結果生成されたcDNAは2μMのdNTPsおよび上記PCRパラメーターを用いてPCRにより増幅された。PCR産物はDNAシーケンシングゲルにより分離された。TK mRNAは、期待さ

mRNAは正常マウス線維芽細胞にのみ存在し、そして腫瘍形成性マウス線維芽細胞には存在しないことが再び確認された。今、図3を参照すると、mRNAを検出するために用いられたプローブを該図の右側に記載された部分で標識し、そしてN1のmRNAの大きさは、該図面の左側に記載された28Sおよび18Sマーカーから見積もることができる。N1のmRNAは対数増殖期の正常細胞および静止正常細胞のいずれにおいても低い量で存在し(レーン1および3)、そして対数増殖期の腫瘍形成性細胞および静止腫瘍形成性細胞のいずれにおいても存在しない(レーン2および4)。対照として、放射性標識されたプローブとして36B4を用いた同じノーザンブロットを再びプローブし、正常および腫瘍形成性のいずれの細胞においても、等しい量のmRNAを証明するように(レーン1-4)、発現される遺伝子がノーザンブロット上に存在した。

#### 実施例4

3つのセルラインにおけるmRNAの発現の比較を実施したが、そのうちのひとつは、2つの異なる条件で培養した後に試験された。そのセルラインとは、初期胚線維芽セルライン("REF")、rasおよびP<sup>53</sup>の変異株("T101-4")を用いて二重形質転換されたREFセルライン、およびrasおよびP<sup>53</sup>の温度感受性変異株("A1-5")を用いて二重形質転換されたREFセルラインであった。A1-5セルラインは非許容温度である37℃において培養され、そして37℃において培養後、mRNAの調製前に許容温度である32.5℃において24時間シフトした。本発明の方法は、プライマー"コザック"および5つの特定されない配列のプライマー、"AP-1、AP-2、AP-3、AP-4、またはAP-5"のうちの一つをそれぞれ第二または第一プライマーとして用いて実施された。

"コザック"プライマーの配列は、mRNAの翻訳開始部位のコンセンサス配列に関する公表コンセンサス配列に基づいて選択された(コザック(Kozak)、1991, Jour. Cell Biology, Vol. 115, pp. 887-903)。翻訳開始部位のコンセンサス配列と実質的に同一の配列を有する簡便(degenerate)コザックプライマーを同時に用い、これらの配

れたとおり、正常および腫瘍形成性mRNA調製物の両方において同じレベルで存在し、まれなmRNA種の代表を例示する目的で良好な内部コントロールを提供した。ひとつの調製物の中には幾つかの他のバンドが存在したが、他の調製物には存在しなく、正常細胞からのmRNAのみにわずかなバンドが存在し、そして腫瘍形成性細胞からのmRNAのみにわずかなバンドが存在し；そして幾つかのバンドは正常細胞および腫瘍形成性細胞中で異なるレベルで発現された。即ち、本発明の方法は、正常に飽え間無く発現される(構造的発現)遺伝子、および分化により発現される遺伝子、抑制される遺伝子、または発現レベルを変える遺伝子を同定するために使用できる。

#### 実施例3において同定されたmRNAのクローニング

3つのcDNA、即ち、TK cDNA、正常細胞中でのみ発現される一つのcDNA("N1")、および腫瘍形成性細胞中でのみ発現される一つのcDNA("T1")は、電気的溶出、エタノール沈殿により尿素および他の汚染物を除去することによりDNAシーケンシングゲルから回収され、そして2つの連続するPCR増幅をそれぞれ40サイクル、20μMのdNTPsの存在下で、T<sub>11</sub>CA【配列番号10】プライマーおよびLtk3【配列番号11】プライマーを用いて、特異性を解決することなく最適な量を達成するために、PCRにより再び増幅された。再び増幅されたPCR産物は、適切なサイズおよびさらなるコントロールとしてのプライマー依存性を有することが確認され、そして再び増幅されたTK cDNAは2つの異なる制限酵素により消化され、そして消化産物が正確なサイズであることも確認された。

再び増幅されたN1【配列番号9】を、TACクローニングシステム(インビトロジェン社)を用いてプラスミドPCR1000中にクローン化し、そして配列を決定した。今、図2を参照すると、ヌクレオチド配列から、N1断片【配列番号9】は、期待されたとおり、下縁部Ltk3プライマー15を5'末端に、そして下縁部T<sub>11</sub>CAプライマー16を3'末端に連結していることが明らかである。

放射性標識N1プローブを用いた全細胞RNAのノーザン分析により、N1の

列は5'-GCCGCCATCG【配列番号12】であり、Rが'dAまたはdGであり、即ち、オリゴデオキシヌクレオチドは、プライマーの混合物をもたらすを与えられたヌクレオチドの一つのみを有する。

5つの特定されないプライマーの配列は以下のとおりである：AP-1は配列5'-AGCCAGCGAA【配列番号13】を有し；AP-2は配列5'-GACCGCTTGT【配列番号14】を有し；AP-3は配列5'-AGGTGACCGT【配列番号15】を有し；AP-4は配列5'-GGTACTCCA【配列番号16】を有し；そしてAP-5は配列5'-GTTGCGATCC【配列番号17】を有する。これらの任意の配列のプライマーは任意に選択された。

mRNAは第一プライマーとしてAPプライマーを用いて逆転写され、そしてその結果のcDNA第一鎖は両プライマー、APプライマーおよび変更コザックプライマーの存在下で、2μMのNTPsおよび上記のPCRパラメーターを用いてPCRにより増幅された。PCR産物はDNAシーケンシングゲルにより分離された。少なくとも50-100の増幅cDNAバンドが試験された各セルラインに存在し、そしていくつかのバンドはそれぞれのセルラインにおいて異なったレベルで発現された。対照として、コザックプライマーの不在下で各特定されないプライマーを用いた反応が実施された。特定されないプライマーのみではcDNAは生成されず、即ち、このことは両方のプライマーが、mRNAからcDNAへの増幅に必要であることが証明される。

今、図4を参照すると、各反応に関して使用されたプライマーセットをプライマーと示された線に沿って図の上部に示す。対照として、mRNAの不在下でプライマーを用いた反応、およびコザックプライマーの不在下でmRNAと共にAP-1を用いた反応を実施した。mRNAの不在下では該プライマーによるcDNAの生成はなく、あるいは特定されないプライマーのみでも生成はなかったことから、mRNAが増幅に必要であること、および両方のプライマーはmRNAからcDNAへの増幅に必要であることが証明される。該増幅によるcDNA産物は同じオーダーでゲルに泳動され、即ち、REFセルラインは各レーン1に示



され、セルラインT101-4は各レーン2に示され、37℃において培養されたセルラインA1-5は各レーン3に示され、そして32.5℃において培養されたセルラインA1-5は各レーン4に示される。プライマーの各対は上記セルラインからの異なるセットのmRNAの増幅をもたらした。コザックプライマーおよびAP-1、AP-2、AP-3、AP-4、またはAP-5をプライマーセットとして用いて実施した反応は、37℃において培養されたセルラインREF、T101-4、A1-5および32.5℃において培養されたA1-5のそれぞれにおいて同じcDNAパターンの増幅をもたらした。各セルラインからのmRNAの増幅、およびコザック変異プライマーおよびAP-3プライマーを用いた温度は、A1-5セルラインを32.5℃において24時間培養した場合に調製された特定のバンドの発見をもたらしたが、該バンドはあらゆる他のmRNA調製物からは発見されず、該バンドは図4でK<sub>1</sub>として示される。即ち、本発明の方法は、変異株のセルラインにおいて別々に発見される遺伝子を同定するために使用可能である。

#### 実施例4で同定されたmRNAのクローニング

32.5℃においてA1-5セルラインを培養した場合にのみ発見したcDNA (K<sub>1</sub>) をDNAシークエンシングゲルから回収し、上記のとおりプライマー、コザックおよびAP-3を用いて再び増幅した。再び増幅されたK<sub>1</sub>のcDNAは約450bpの適切な大きさを有することが確認され、そしてインビトロジェン社のTAクローニングシステムを用いて使用説明書にしたがってベクターpCR11中にクローニングされ、そして配列を決定された。今、図5を参照すると、K<sub>1</sub>クローンはその5'末端に下線部コザックプライマー20、および3'末端に下線部AP-3プライマー21を連結していることが、ヌクレオチド配列から明らかに示される。この部分的cDNAの5'末端は配列番号18であると同定され、そしてこのcDNAの3'末端は配列番号19であると同定される。この部分的配列はオープンリーディングフレームであり、そして遺伝子データベースEMBOおよびGenbankの検索によると、K<sub>1</sub>の3'部分からの翻訳アミノ酸配列がユビキチン連結酵素ファミリー(UBC酵素)と相同であること

が明らかとなった。K<sub>1</sub>の3'部分からの該翻訳アミノ酸配列は、D. melanogaster (メラノガスター)のUBC酵素と100%同一であり、そしてUBC-4酵素と75%同一であり、そして酵母S. saccharomyces (サッカロマイセス)のUBC-5酵素と79%同一であり；そしてArabidopsis thaliana (アラビドプシス サリアナ)のUBC酵素と75%同一である。K<sub>1</sub>クローンはこの遺伝子の実際の5'末端を含んでよいが、そうでなければ、コザックプライマーは5'末端の直後でハイブリダイズする。この結果から、本発明の方法を用いて遺伝子の5'コーディング配列をクローン化することができることが証明される。

#### 使用法

本発明の方法を用いることより、任意の数の標からmRNAを同定、単離およびクローン化することができる。該方法は、単離後の単一の可視調査により所望のmRNAの同定を提供し、そして研究調査、工業的応用および医療的応用に用いることができる。

例えば、再び増幅されたcDNAは、塩基配列決定することができ、または完全長の遺伝子を得るためにDNAライブラリーをスクリーニングするために使用できる。cDNAの配列が決定されたならば、アミノ酸ペプチドを翻訳蛋白質配列から作ることができ、そして抗体の作成に使用できる。これらの抗体は該遺伝子産物のさらなる調査およびその機能の調査に使用でき、または医療用診断および予後に応用できる。再び増幅されたcDNAはさらなる増幅のために適切なベクター中にクローン化することができ、またはインビトロまたはインビボにおいて発現されるために適切なベクター中にクローン化できる。発現ベクター中にクローン化されたcDNAは蛋白質産物の大量生産のための工業的状況において使用することができる。他の応用としては、再び増幅されたcDNAまたはそれらの対応するクローンは、インサイチュハイブリダイゼーションのプロープとして使用されるであろう。そのようなプロープは疾患の診断および予後にも用いることができる。

他の態様

他の態様は請求の範囲の範囲内である。

オリゴデオキシヌクレオチドの長さは、選択されるアニーリング温度に依存して変更可能である。好ましい態様においては、温度は42℃に選択され、そしてオリゴヌクレオチドの長さは少なくとも9ヌクレオチドに選択される。アニーリング温度を35℃に低下したのならば、オリゴヌクレオチドの永さは少なくとも6ヌクレオチドに減らすことができる。

cDNAは<sup>32</sup>S以外、例えば<sup>33</sup>Pおよび<sup>35</sup>Pで標識されたヌクレオチドにより放射性標識することができる。必要であれば、非放射性イメージング法も、本発明の方法に適用することができる。

cDNAの増幅は、上記されたとおり、連続ラウンドの合成、アニーリングおよび伸長合成のための温度循環の間、温度循環ポリメラーゼチェーンリアクションにより、反復コピーのcDNAのための熱安定性DNAポリメラーゼを用いて達成することができる。あるいは、該増幅は、一定温度(isothermal) DNA増幅法(Waikerら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 89, pp. 392-396)により達成することができる。該一定温度増幅法は適切な制限酵素認識配列を含むことによりcDNAを増幅するための使用に適合させられるはずであり、該配列の一つは一方の鎖がホスホロチオエート化された認識部位でニックが入られ、その認識部位はα<sup>32</sup>S標識dNTPを用いて再生することができる。

同様の機能または同様の機能ドメインを有する蛋白質は、しばしば遺伝子ファミリーのひとつと呼ばれる。多くのこのような蛋白質はクローニングされ、そしてファミリーのメンバー間で高度に保存されているコンセンサス配列を含むことが同定されている。配列のこの保存は、ファミリーの新しいメンバー、または関連したメンバーのクローニングのためのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーのデザインに使用することができる。本発明の方法を用いれば、細胞由来のmRNAは逆転写することができ、そしてcDNAは、公知のmRNAの配列と実際の同一の配列を有する少なくともひとつのプライマーを用いて増幅される。少なくとも以下のファミリーおよび機能ドメインに関するコンセンサス配列は文献

に記載されている：蛋白質チロシンキナーゼ(Hanksら、1991、Methods on Enzymology, Vol. 200, pp. 533-546)；ホメオボックス遺伝子：ジクフィンガー-DNA結合蛋白質(Millerら、1985、EMBO Jour., Vol. 4, pp. 1609-1614)；リセプター蛋白質；分泌蛋白質のシグナル配列；核に存在する蛋白質(Guiochon-Mantelら、1989、Vol. 57, pp. 1147-1154)；セリンプロテアーゼ；セリンプロテアーゼの阻害剤；サイトカイン；チロシンキナーゼおよび他の蛋白質において記載されているSH2およびSH3ドメイン(Pawsonら、1992、Cell, Vol. 71, pp. 359-362)；セリン/チロシンおよびチロシンホスファターゼ(Cohen, 1991、Methods in Enzymology, Vol. 201, pp. 398-408)；サイクリンおよびサイクリン依存性プロテインキナーゼ(CDKs) (例えば、Keyomarsiら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 90, pp. 1112-1116)。

任意のコンセンサス配列に関するプライマーは、アミノ酸のコンセンサス配列に基いて容易にデザインすることができる。ひとつまたは複数の部位における簡便(degeneracy)の利用は所望のコンセンサス配列を含む高いパーセンテージ、即ち50%以上、のmRNAにハイブリダイズするプライマーのデザインを可能にする。

本発明の方法において使用するためのプライマーは、ジクフィンガー-DNA結合蛋白質のコンセンサス配列に基いて、例えば、蛋白質PYVCのコンセンサス配列に基いてデザインすることができる。このファミリーのさらなるメンバーのクローニングのために有用なプライマーは、以下の配列：5'-GTAYGCNTGT [配列番号20] または5'-GTAYGCNTGC [配列番号21] を有することができるが、その類、Yは、プライマーがその位置で簡便した場合のデオキシヌクレオチドdTまたはdCであり、そしてNは、イノシン("I")である。塩基イノシンは他のすべての塩基と対を形成することができ、そしてバリン"V"がこの位置で高い頻度で簡便した場合のオリゴデオキシヌクレ

## 配列表

オチドの位置に関して選択された。使用される、記載されたオリゴデオキシヌクレオチドプライマーは、5' -GTATGCITGTと5' -GTACGCITGTの混合物、または5' -GTATGCITGCと5' -GTACGCITGCの混合物である。

配列番号: 1  
配列の長さ: 13  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 一本鎖  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
ハイボセティカル配列: No  
アンチセンス: No

配列  
TTTTTTTTT TVN

13

配列番号: 2  
配列の長さ: 13  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 一本鎖  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
ハイボセティカル配列: No  
アンチセンス: No

配列  
TTTTTTTTT TTN

13

配列番号: 3  
配列の長さ: 13  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
ハイボセティカル配列: No  
アンチセンス: No  
配列

TTTTTTTTT VNN

13

配列番号: 4  
配列の長さ: 10  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 一本鎖  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
ハイボセティカル配列: No  
アンチセンス: No  
配列

NNTTTATTNN

10

配列番号: 5  
配列の長さ: 10  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 一本鎖  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
ハイボセティカル配列: No  
アンチセンス: No  
配列

GCCTTATTNC

10

配列番号: 6  
配列の長さ: 10  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 一本鎖  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
ハイボセティカル配列: No  
アンチセンス: No

配列  
NNNANNATGN

10

配列番号: 7  
配列の長さ: 10  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 一本鎖  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
ハイボセティカル配列: No  
アンチセンス: No

配列  
NNNANNATGG

10

配列番号: 8  
配列の長さ: 10  
配列の型: 核酸  
鎖の数: 一本鎖  
トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

GCCACCATGG

10

配列番号: 9

配列の長さ: 260

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

CTTGATTGCC TCTACAGCA GTTCAGGCA CCTTAGCTG TACCATGAAG TTCACAGTCC 60  
 GGGATTGTGA CCTAATACT GGAGTTCCAG ATGAAGATGG ATATGATGAT GAATATGTCC 120  
 TCGAAGATCT TGAGGTAACG GTGTCTGATC ATATTCAGAA GATACTAAAA CCTAAGTCCG 180  
 CTGCTGCGCTG GGAAGAGGTG GGAGGAGCAG CTGGCAGAGA GCGTCTCTT CACAGAGGGG 240  
 TCCTGGGTGA AAAAAAAAAA 260

配列番号: 10

配列の長さ: 13

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

AGCCAGCGAA

10

配列番号: 14

配列の長さ: 10

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

GACCGCTTGT

10

配列番号: 15

配列の長さ: 10

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

アンチセンス: No

配列

TTTTTTTTT TCA

13

配列番号: 11

配列の長さ: 10

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

GTTCATTGCC

10

配列番号: 12

配列の長さ: 10

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

GCCGCCATGG

10

配列番号: 13

配列の長さ: 10

配列

ACGTGACCGT

10

配列番号: 16

配列の長さ: 10

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

GGTACTCCAC

10

配列番号: 17

配列の長さ: 10

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

GTTCGGATCC

10

配列番号: 18

配列の長さ: 42

配列の型: 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GCGGCATGG CTCTGAAGAG AATCCACAAG GACACCCATG AA

42

配列番号：19

配列の長さ：78

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GTTGCATTTA CAACAAGAAT TTATCATCCA AATATTAACA GTAATGGCAG CATTGTCTTT 60

GATATCTAC GGTACCTT

78

配列番号：20

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GTAYGCTGT

10

配列番号：21

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GTAYGCTTGC

10

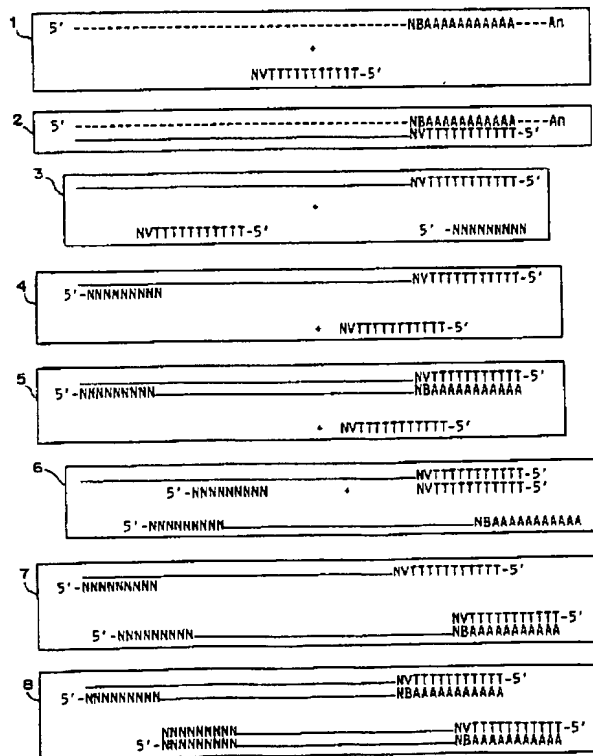


FIG. 1

FIG. 2

10	20	30	40	50	60
CTTGATTGCC	TCCTACAGCA	GTTGCAGGCA	CCTTTAGCTG	TACCATGAAG	ITCAGAGTCC
15	70	80	90	100	110
GGGATTGTGA	CCCTAATACI	GGAGTCCAG	ATGAAGATGG	ATATGATGAT	GAATATGTGC
130	140	150	160	170	180
TGGAAGATCT	TGAGGTAACI	GTGCTGATC	ATATTCAGAA	GATACTAAAA	CCTAAGCTCG
190	200	210	220	230	240
CTGCTGCCTG	GGAAGAGGTG	GGAGGAGCAG	CTGCGACAGA	GCCTCTCTT	CACAGAGGGG
250	260				
TCCTGGGTGA	AAAAA				

16

FIG. 3

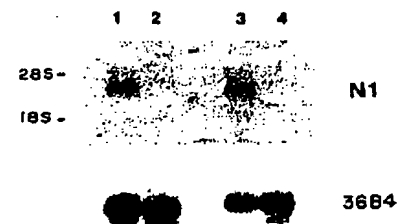
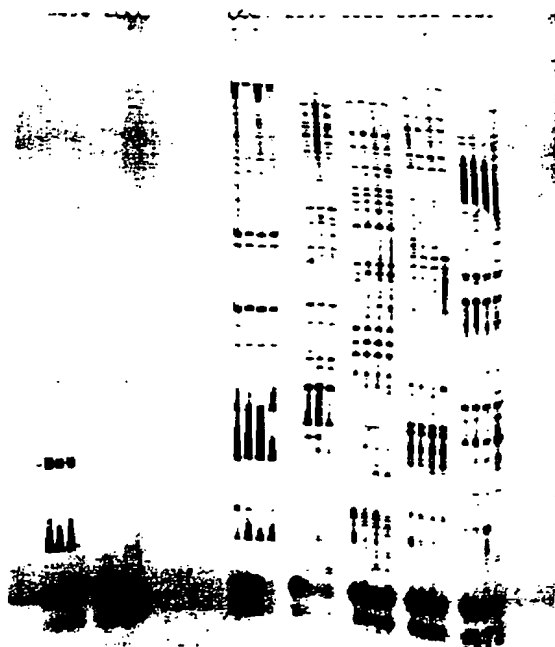


FIG. 4

プライマー コダック  
AP-1 AP-2 AP-3 AP-4 AP-5  
レーン 1234 1234 1234 1234 1234



5'-GCCAGCATGCTCTGAAGAGAATCCACAAGGACACCCATGAA.....  
コダック  
.....GTTGCATTACACAAGAA  
TTTATCATCCAAATATTAAAGTAATGCCAGCATTTGTCTTGTATTTCTACGGTCACCT-3'  
3' TGGCAGTGGG-5'  
AP-3

FIG. 5

国際調査報告		International application No. PCT/US93/02246
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(2) : C12N 1/04 US CL : 435/11		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classifications and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 435/6, 91, 935/21		
Documentation searched other than minimum documentation in the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
APS, CA, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. Innis et al. "PCR PROTOCOLS. A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS", published 1990 by ACADEMIC PRESS, INC.(CALIFORNIA), see pages 60-69.	1-52
Y	US, A, 4,683,195 (MULLIS ET AL) 28 JULY 1987, see column 5, lines 44-53, column 10, lines 47-57, claim 10.	1-52
Y	D. FREILFELDER, "MOLECULAR BIOLOGY. A COMPREHENSIVE INTRODUCTION TO PROKARYOTES AND EUKARYOTES", published 1983 by JONES AND BARTLETT PUBLISHERS, Inc. (BOSTON), see pages 402-404.	16-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See pages 69-71 notes.		
* "Special categories of cited documents" "A" documents defining the generic state of the art which is not considered to be part of prior art "B" prior documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "C" documents which are cited solely for their disclosure of information not relevant to the invention "D" documents referring to or containing, in whole or in part, the invention "E" documents published prior to the international filing date but not considered to be part of prior art "F" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "G" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "H" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "I" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "J" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "K" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "L" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "M" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "N" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "O" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "P" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "Q" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "R" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "S" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "T" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "U" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "V" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "W" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "X" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "Y" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art "Z" documents published on or after the international filing date but not considered to be part of prior art		
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report
29 April 1993		17 MAY 1993
Name and mailing address of the ISA/ST		Authorized officer
Communication of Results and Transmittal		PAUL S. TRAN, PH.D.
See PCT		Telephone No. (703) 305-0156
Facsimile No. NOT APPLICABLE		
Pages PCT/ISA/210 (issued since July 1993)		

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), CA, JP

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成8年(1996)7月16日

【公表番号】特表平7-500735

【公表日】平成7年(1995)1月26日

【年通号数】

【出願番号】特願平5-516011

【国際特許分類第6版】

C12N 15/09

C12Q 1/68 A 9453-4B

【FI】

C12N 15/00 A 9281-4B

手 続 補 正 書

平成 8 年 2 月 20 日

特許庁長官 清 川 祐 二 殿

## 1. 事件の表示

平成5年特許第516011号

## 2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

名 称 ダナーファーバー・キャンサー・インスティテュート・  
インコーポレーテッド

## 3. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル206区

電 話 3270-6641~6646

氏 名 (2770) 井 田 士 湯 浅 恭 三

## 4. 補正の対象

請求の範囲

## 5. 補正の内容

別紙の通り

(別紙)

請求の範囲を次のとおり補正する

「1. mRNAのポリアデノシン(ポリA)テイルの一部分並びに該部分のすぐ上流の非ポリAヌクレオチド少なくとも1つにハイブリダイズする第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーにmRNAを接触させ、

第一プライマーを用いてmRNAを逆転写することにより、mRNAに相補的な第一DNA鎖を生成し、

第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマーが第一DNA鎖とハイブリダイズする条件下で、第一DNA鎖を第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマーと接触させ、

第二プライマーを伸長合成することにより、第一DNA鎖に相補的な第二DNA鎖を生成し、そして

第一プライマーおよび第二プライマーを用いて第一DNA鎖および第二DNA鎖を増幅することにより、DNAをクローン化する  
工法からなる、核酸サンプル中の、mRNAに相補的なDNAを単離するための非特異的クローニング法。

2. 第一プライマーが、ポリAテイルの一部分並びに該部分のすぐ上流の2つの非ポリAヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項1記載の方法。

3. 第一プライマーが、少なくとも11ヌクレオチドからなるポリA相補的領域、およびポリA相補的領域のすぐ下流の少なくとも1ヌクレオチドからなる非ポリA相補的領域を含む、請求項1記載の方法。

4. 非ポリA相補的領域が少なくとも2つの連続したヌクレオチドからなる、請求項3記載の方法。

5. mRNAのポリAシグナル配列を含む部位においてmRNAとハイブリダイズする第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーにmRNAを接触させ、

第一プライマーを用いてmRNAを逆転写することにより、mRNAに相補的な第一DNA鎖を生成し、

第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマーが第一DNA鎖とハイブリダイズする条件下で、第一DNA鎖を第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマー

と接触させ、

第二プライマーを伸長合成することにより、第一DNA鎖に相補的な第二DNA鎖を生成し、そして

第一プライマーおよび第二プライマーを用いて第一DNA鎖および第二DNA鎖を増幅することにより、DNAをクローン化する工程からなる、核酸サンプル中の、mRNAに相補的なDNAを単離するための非特異的クローニング法。

6. 第一プライマーが、少なくとも11の連続チミジン、およびポリAシグナル配列のすぐ上流にハイブリダイズする少なくとも1つの非チミジン残基からなる、請求項1記載の方法。

7. mRNA分子を含む第一核酸サンプルを用意し、

mRNA分子を含む第二核酸サンプルを用意し、

第一核酸サンプルおよび第二核酸サンプル中のmRNAに存在するポリAデノシン(ポリA)トラクトの一部並びにポリA部分のすぐ上流の非ポリAヌクレオチド少なくとも1つにハイブリダイズする第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーに、第一核酸サンプルおよび第二核酸サンプル各々を接触させ、

第一プライマーがハイブリダイズするmRNAを逆転写することにより、第一プライマーがハイブリダイズする第一核酸サンプル中のmRNAに相補的な第一DNA鎖集団、および第一プライマーがハイブリダイズする第二核酸サンプル中のmRNAに相補的な第二DNA鎖集団を生成し、

第一および第二集団中の少なくとも幾つかのDNA鎖に第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマーがハイブリダイズする条件下で、第一DNA鎖集団および第二DNA鎖集団を第二プライマーと接触させ、

第二プライマーを伸長合成することにより、第二プライマーがハイブリダイズする第一集団中のDNA鎖に相補的な第三DNA鎖集団、および第二プライマーがハイブリダイズする第二集団中のDNA鎖に相補的な第四DNA鎖集団を生成し、そして

第一プライマーおよび第二プライマーを用いて第一DNA鎖集団および第三DNA鎖集団中のDNA鎖の一部を増幅することにより、第一増幅産物集団を

成。

18. 第二プライマーのヌクレオチド配列がランダムに選択される、請求項13記載の方法。

19. 第一プライマーまたは第二プライマーのヌクレオチド配列が制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む、請求項7記載の方法。

20. 第一プライマーおよび第二プライマーの少なくとも1つが複数のオリゴデオキシヌクレオチドからなる、請求項7記載の方法。

21. 複数のオリゴデオキシヌクレオチドが同じヌクレオチド配列を有する複数のオリゴデオキシヌクレオチド分子を含む、請求項20記載の方法。

22. 複数のオリゴデオキシヌクレオチド中の個々のオリゴデオキシヌクレオチド分子が異なるヌクレオチド配列を有する、請求項20記載の方法。

23. 第一オリゴデオキシヌクレオチドが、公知配列のmRNA内に含まれる配列と実質的に同一の配列を含む、請求項7記載の方法。

24. さらに、第一増幅産物集団中の個々の増幅産物の存在またはレベルと第二増幅産物集団中の違いを検出する工程を含む、請求項7記載の方法。

25. dNTPsの濃度を約20μM以下にして各々の増幅工程をポリメラーゼチェーンリアクションにより実施する、請求項7記載の方法。

26. dNTPsの濃度を約2μMにして各々の増幅工程をポリメラーゼチェーンリアクションにより実施する、請求項7記載の方法。

27. 比較工程において、ゲル電気泳動並びに特定サイズのバンドの存在またはレベルの比較により、第一増幅産物集団および第二増幅産物集団各々を解析する、請求項7記載の方法。

28. 第一細胞が腫瘍形成細胞からなり、そして第二細胞が正常細胞からなる、請求項7記載の方法。

29. さらに、第一増幅産物集団または第二増幅産物集団からの個々の増幅産物をクローン化する工程を含む、請求項7記載の方法。

30. ポリアデノシン(ポリA)トラクトの一部並びに該部分のすぐ上流の非ポリAヌクレオチド少なくとも1つにハイブリダイズする、少なくとも1つの第一オリゴデオキシヌクレオチド、および

生成し、

第一プライマーおよび第二プライマーを用いて第二DNA鎖集団および第四DNA鎖集団中のDNA鎖の一部を増幅することにより、第二増幅産物集団を生成し、そして

第一増幅産物集団と第二増幅産物集団中の個々の増幅産物の存在またはレベルを比較する

工程からなる、2つ以上の核酸サンプル中の、個々のmRNA分子の存在またはレベルを比較する方法。

8. 第一核酸サンプルが第一細胞中で発現されたmRNAを含む、そして第二核酸サンプルが第二細胞中で発現されたmRNAを含む、請求項7記載の方法。

9. 第一核酸サンプルが第一発生段階の第一細胞中で発現されたmRNAを含む、そして第二核酸サンプルが第二発生段階の第二細胞中で発現されたmRNAを含む、請求項7記載の方法。

10. 第一プライマーが、ポリA部分およびポリA部分のすぐ上流の少なくとも2つのヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項7記載の方法。

11. 第一プライマーが、ポリA部分およびポリA部分のすぐ上流の少なくとも1つのヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項7記載の方法。

12. 第一プライマーが、少なくとも11ヌクレオチドからなるポリA相補的領域、およびポリA相補的領域のすぐ下流の少なくとも1ヌクレオチドからなる非ポリA相補的領域を含む、請求項7記載の方法。

13. 非ポリA相補的領域が少なくとも2つの連続したヌクレオチドからなる、請求項12記載の方法。

14. 非ポリA相補的領域が3'-NVを含むが、但しVはデオキシアデノシン、デオキシチジンまたはデオキシグアニンである、請求項12記載の方法。

15. 第一プライマーが少なくとも13ヌクレオチドからなる、請求項12記載の方法。

16. 第一プライマーが少なくとも6ヌクレオチドからなる、請求項7記載の方法。

17. 第一プライマーが少なくとも9ヌクレオチドからなる、請求項7記載の方

法。少なくとも1つの第二オリゴデオキシヌクレオチド

を含むキット。

31. 少なくとも1つの第一オリゴデオキシヌクレオチドが、ポリA領域の一部並びに該部分のすぐ上流の少なくとも2つのヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項30記載のキット。

32. 少なくとも1つの第一オリゴデオキシヌクレオチドが、ポリA領域の一部並びに該部分のすぐ上流の1つのヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項30記載のキット。

33. 第一オリゴデオキシヌクレオチドが、少なくとも11ヌクレオチドからなるポリA相補的領域、およびポリA相補的領域のすぐ下流の少なくとも1ヌクレオチドからなる非ポリA相補的領域を含む、請求項30記載のキット。

34. 非ポリA相補的領域が少なくとも11の連続チミジンからなる、請求項33記載のキット。

35. 非ポリA相補的領域が少なくとも2つの連続ヌクレオチドからなる、請求項33記載のキット。

36. 非ポリA相補的領域が3'-NVを含むが、但しVはデオキシアデノシン、デオキシチジンまたはデオキシグアニンのいずれかであり、そして、Nはデオキシアデノシン、デオキシチミン、デオキシシチジンまたはデオキシグアニンのいずれかである、請求項33または34記載のキット。

37. 第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも13ヌクレオチドからなる、請求項33記載のキット。

38. 第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも6ヌクレオチドからなる、請求項33記載のキット。

39. 第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9ヌクレオチドからなる、請求項33記載のキット。

40. 第二オリゴデオキシヌクレオチドのヌクレオチド配列がランダムに選択される、請求項38記載のキット。

41. 第一オリゴデオキシヌクレオチドまたは第二オリゴデオキシヌクレオチドのヌクレオチド配列が、選択された任意の配列を含む、請求項38記載のキット。



以上

42. 第一オリゴデオキシヌクレオチドまたは第二オリゴデオキシヌクレオチドのヌクレオチド配列が、制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む、請求項30記載のキット。

43. 第一オリゴデオキシヌクレオチドまたは第二オリゴデオキシヌクレオチドが、公知配列のmRNA内に含まれる配列と同一の配列を含む、請求項30記載のキット。

44. 第一オリゴデオキシヌクレオチドまたは第二オリゴデオキシヌクレオチドの少なくとも1つが複数のオリゴデオキシヌクレオチドからなる、請求項30記載のキット。

45. 複数のオリゴデオキシヌクレオチドが同じヌクレオチド配列を有する複数のオリゴデオキシヌクレオチド分子を含む、請求項44記載のキット。

46. 複数のオリゴデオキシヌクレオチド中の個々のオリゴデオキシヌクレオチド分子が異なるヌクレオチド配列を有する、請求項44記載のキット。

47. 第一オリゴデオキシヌクレオチドが、 $T_{11}MG$ 、 $T_{11}MA$ 、 $T_{11}MT$ 、 $T_{11}MC$ 、 $T_{12}MG$ 、 $T_{12}MA$ 、 $T_{12}MT$ 、 $T_{12}MC$ およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項30記載のキット。

48. 第二オリゴデオキシヌクレオチドが、AP-1 (配列番号13)、AP-2 (配列番号14)、AP-3 (配列番号15)、AP-4 (配列番号16)、AP-5 (配列番号17) およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項30記載のキット。

49. さらに、逆転写バッファー、リバーstransスクリプターゼ、dNTPs、PCRバッファー、対照RNA、グリコーゲン、水および泳動染料のうちのひとつ以上を含む、請求項30記載のキット。

50. さらに、細胞からmRNAを単離するための試薬を含む、請求項30記載のキット。

51. さらに、2以上の複製サンプル中の個々のmRNA分子の存在またはレベルを比較するための第一オリゴデオキシヌクレオチドおよび第二オリゴデオキシヌクレオチドの使用指示書を含む、請求項30記載のキット。」

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**